

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРАСКИ
ОПЕРЕНИЯ КУРИЦЫ. II. АНАЛИЗ ФОРЕТГРАММ АВСТРАЛОРПОВ (СС)
И БЕЛЫХ ПЛИМУТРОКОВ (сс)

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Принято считать, что основным ферментом, участвующим в образовании пигмента меланина у животных, является тирозиназа (ДОФА-оксидаза), которая осуществляет превращение тирозина в ДОФА (3,4-диоксифенилаланин) и ДОФА в ДОФА-хинон; далее, как предполагается, процесс образования меланина протекает самопроизвольно (Nicolaus, 1968). В последние годы обсуждается вопрос об участии пероксидазы в пигментогенезе. Пероксидаза является менее специфичным ферментом, чем тирозиназа, и способна окислять цистеин, триптофан, аскорбиновую кислоту, билирубин, тирозин, адреналин, моноамины, диамины, моно- и дифенолы (Sizr, 1953). В серии работ Окун с сотр. гистохимическими методами было показано, что пероксидаза присутствует в тучных клетках, гранулоцитах, нейронах, в меланоцитах меланом и нормальных тканей млекопитающих и способна превращать тирозин и ДОФА в меланин (Окун е.а., 1970 а; 1970 б; 1971; Patel, Okun, 1971; Patel е.а., 1974). Эти авторы считают, что окисление тирозина в ДОФА осуществляет пероксидаза, а тирозиназа обладает лишь ДОФА-оксидазной активностью. Другими исследователями в работе, выполненной теми же методами на трех различающихся по генам окраски линиях кур, было установлено, что тирозиназа курицы способна окислять как тирозин, так и ДОФА (Brumbaugh е.а., 1973).

Ранее нами при электрофоретическом анализе пульпы растущего пера к кур разных генотипов была получена ДОФА-оксидазная реакция у кур породы белый плимутрок (сс), несмотря на отсутствие меланоцитов в их пере.

В данной работе проводится сравнительный анализ ферментативной активности на зимограммах кур, имеющих и не имеющих меланоцитов в перьях.

Материал и методы. Исследовали кур двух пород: белый плимутрок (сс) и австралорп (СС). Куры породы австралорп имеют интенсивно черное оперение, что отражает активное состояние пигментсинтезирующей системы.

В анализ брали растущие перья длиной около 1 см со спинной части животного. Пульпу выдавливали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,25 М растворе сахарозы, содержащем 10^{-4} М β -меркаптоэтанола (отношение вес/объем = 0,1 г/мл). Полученный гомогенат замораживали в испарителе бытового холодильника и оставляли на ночь. Перед анализом препараты размораживали и выдерживали 3-4 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, после чего пробы центрифугировали при 1000g в течение 10 мин и надосадочную жидкость подвергали электрофорезу по Дэвису (Davis, 1964) в некоторой модификации. Высота концентрирующего геля составляла 1,5 см, а высота 7%-ного разделяющего геля - 10 см. В каждую трубку под слой электродного буфера наносили по 0,2 мл исследуемого раствора. Электрофорез вели при токе 2-3 мА на трубку в течение 3 ч. После окончания электрофореза гелевые столбики, в которых выявляли тирозиназу, помещали в 1,0 М фосфатный буфер (рН 6,7) на 30-40 мин, а затем в 0,1 М фосфатный буфер (рН 6,8), содержащий 0,15% L-ДОФА.

Для выявления пероксидазной активности использовали гистохимическую реакцию на железосодержащие белки (Ширс, 1962). Гели инкубировали при

константной температуре в течение 8-12 ч. Кроме того, в некоторые пробы окисление L-ДОФА в качестве субстрата, добавляли по 1 капле 3% H_2O_2 и реакцию в таких пробирках останавливали по истечении 30 мин. Исследовали отношение ферментов к следующим ингибиторам тирозиназы: тиомочевина 10^{-2} М, ЭДТА 10^{-2} М, цистеин 10^{-3} М и 10^{-4} М, фенилаланин 10^{-2} М. Ингибиторы в данных концентрациях вводили как в прединкубационный, так и в инкубационный буфер. Гели фотострогировали в 7%-ной уксусной кислоте в проходящем свете на установке "Беларусь-2".

Результаты и обсуждение. Анализ динамики появления окрашенных продуктов в гелевом столбике с разделенными белками пульпы пера австралорпов, находящемся в растворе L-ДОФА, показал, что меланин появляется в зоне 1 приблизительно через 30-40 мин после начала реакции, а спустя 4-5 ч начинается потемнение гелей в зонах 2 и 3 (рис.1,а). При внесении перекиси водорода (которая необходима для действия пероксидазы) в инкубационную среду уже через 30 мин наблюдалось заметное потемнение гелей в зонах 2 и 3 (рис.1,б). Учитывая способность пероксидазы окислять фенолы и их производные (Sizr, 1953; Okun e.a., 1970 a, 1970 b, 1971; Patel, Okun, 1971; Patel e.a., 1974) можно предположить, что зоны 2 и 3 образуются в результате пероксидазной активности. В отношении зоны 2 можно высказать более определенное предположение, так как после электрофореза в этой зоне наблюдалась красноватая полоса, представленная, по-видимому, гемоглобином, который, как известно, обладает пероксидазной активностью.

Сходное явление отмечалось Барнетт с сотр. при электрофоретическом анализе экстрактов пульпы волос мышей (Burnett e.a., 1969). Эти авторы отмечали медленное неспецифическое окисление гемоглобином L-ДОФА и образование одной полосы, которая мигрирует медленней тирозиназы.

Убедительным доказательством того, что фракция 1 представлена ДОФА-оксидазой, а зона 2 обусловлена пероксидазной активностью, являются результаты, представленные на рис.2. На рис.2(б,в) видно, что и у австралорпов, и у белых плимутроков реакция на железосодержащие белки аналогична. Отсутствие зоны 3 можно, по-видимому, объяснить не вполне оптимальными условиями выявления фермента пероксидазы. Наличие зоны 1 у австралорпов, имеющих специфические меланинсинтезирующие клетки — меланоциты, и отсутствие этой зоны у белых плимутроков, не имеющих таких клеток, является прямым доказательством того, что зона 1 на электрограммах экстрактов пульпы пера обусловлена действием фермента, специфичного для меланоцитов, а именно ДОФА-оксидазой.

На рис.3 представлены результаты воздействия некоторых соединений, известных как ингибиторы тирозиназы. Тиомочевина в концентрации 10^{-2} М и цистеин в концентрации 10^{-2} М ингибируют проявление ферментативной активности во всех трех зонах. Вероятно, это происходит за счет образования слабо диссоциирующего комплекса с медью тирозиназы и железом пероксидазы (рис.3,а,б). ЭДТА (10^{-3} М), являясь тиоловым ингибитором (Ramakrishna Rao, Shanmugasundaram, 1967), заметно ингибирует проявление энзиматической активности в зоне 1 (рис.3,в). Фенилаланин (10^{-2} М), который является конкурентным ингибитором тирозиназы (Lerner, 1953), и цистеин (10^{-3} М) незначительно ослабляют активность тирозиназы (зона 1), а в зонах 2 и 3 оказывают стимулирующий эффект, возможно, за счет того, что сами являются субстратами для пероксидазы (рис.3,б,в). Таким образом, можно заключить, что реакция на примененные ингибиторы в исследуемых зонах различна.



Рис.1. Электрофореграммы австралорпов.

α - инкубация в течение 12 ч в 0,15% р-ре L-ДОФА; δ - инкубация в течение 30 мин в 0,15% р-ре L-ДОФА с добавлением 1 капли 3% H_2O_2 .

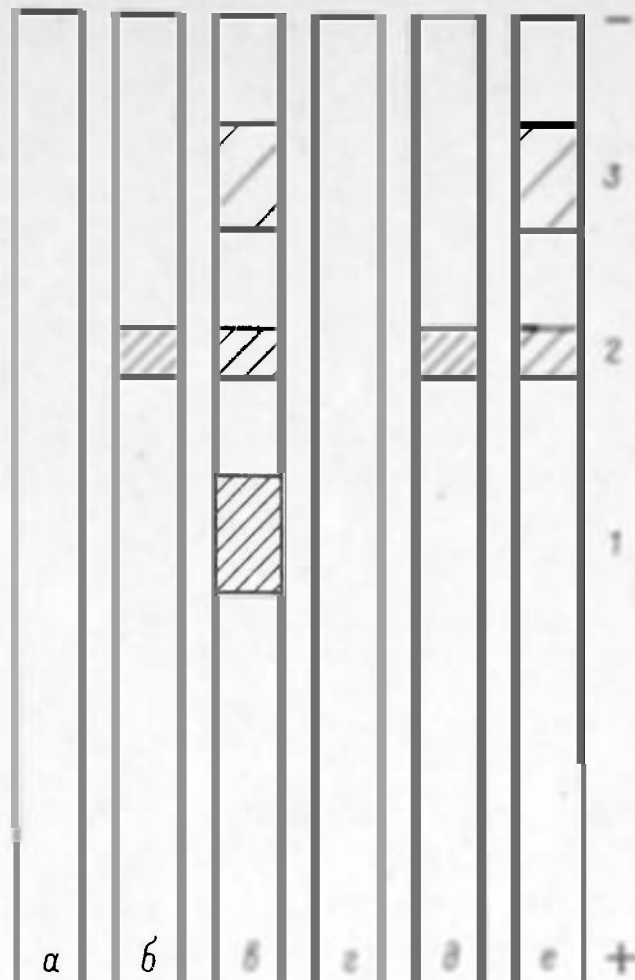


Рис.2. Электрофореграммы австралорпов (α, δ, δ) и белых плимутроков ($\epsilon, \delta, \epsilon$).

α, ϵ - инкубация в р-ре бензидина; δ, δ - инкубация в р-ре бензидина + H_2O_2 ; δ, ϵ - инкубация в 0,15% р-ре L-ДОФА.

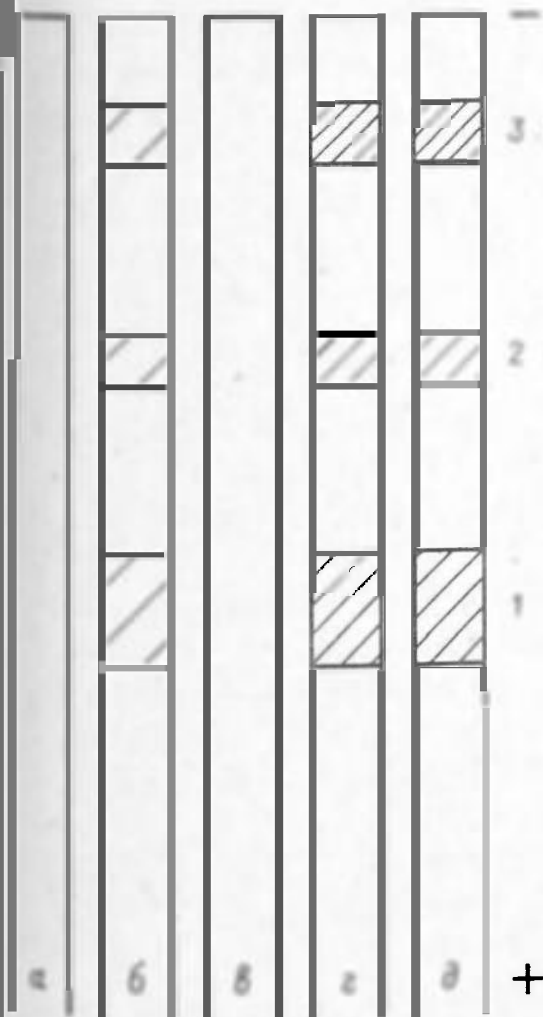


Рис.3. Действие ингибиторов.

α - тиомочевина 10^{-2} М; δ - ЭДТА 10^{-2} М; δ - цистеин 10^{-2} М; ϵ - цистеин 10^{-3} М; δ - фенилаланин 10^{-2} М.

З а к л ю ч е н и е

У животных меланин образуется в специализированных клетках - меланоцитах - при действии фермента тирозиназы (ДОФА-оксидазы). Электрофоретический анализ белковых экстрактов пульпы пера обнаружил ДОФА-положительную реакцию в перьях кур породы белый плимутрок (сс), не имеющих меланоцитов. Более детальный анализ позволил установить, что эта реакция обусловлена ферментами, обладающими пероксидазной активностью.

S u m m a r y

Animal melanins are formed in the melanocytes by action of tyrosinase (dopa-oxidase). Polyacrylamide gel electrophoregrams of extracts of pigmented feathers (Australorp, CC) and nonpigmented feathers (White Plymouth Rock, cc) indicated dopa-positive reaction.

Slow bands are peroxidases and fast band in dopa-oxidase. White Plymouth Rock has no fast band.

У к а з а т е л ь л и т е р а т у р ы

П и р с Э. Гистохимия. М., 1962. 692 с.

B r u m b a u g h J., B o w e r s R., L e e K. Histochemical evidence that peroxidase does not affect melanin formation in feather melanocytes. - "Gale J. Biol. Med.", 1973, vol.46, N 5, p.523-534.

B u r n e t t J.B., H o l s t e i n T.J., Q u e v e d o W.C. Electroforetic variations of tyrosinase in follicular melanocytes during the hair growth cycle in mice. - "J. Exp. Zool.", 1969, vol.171, N 3, p.369-376.

D a v i s B.Y. Disk-electrophoresis. Method and application to human serum proteins. - "Ann. N.Y. Acad. Sci.", pt II, 1964, N 121, p.404-427.

L e r n e r A.B. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. - In: Advances in Enzymology, 1953, vol.XIV, p.73-128.

N i c o l a u s R.A. Melanins. Hermann Paris, 1968. 310 p.

O k u n M.R., E d e l s t e i n L.M., O r N u r e a. Histochemical studies of conversion of tyrosine and dopa to melanin mediated by mammalian peroxidase. - "Life Sci.", 1970a, vol.11, N 9, p.491.

O k u n M.R., E d e l s t e i n L.M., O r N u r e a. Histochemical differentiation of peroxidase-mediated from tyrosinase-mediated melanin formation in mammalian tissues. The biologic significance of peroxidase-mediated oxidation of tyrosine to melanin. - "Histochemie", 1970b, vol.23, N 4, p.295-309.

O k u n M.R., H a m a d a G., D o n n e l l a n B. Latency of the DOPA reaction in mast cells. - "Histochemie", 1971, vol.25, N 1, p.1-8.

P a t e l R.P., O k u n M.R. Biochemical studies of the peroxidase-mediated oxidation of tyrosine to melanin: demonstration of the hydroxylation of tyrosine by plant and human peroxidases. - "Biochem. J.", 1971, vol.124, N 2, p.439-441.

P a t e l R.P., O k u n M.R., E d e l s t e i n L.M. e.a. Peroxidatic conversion of tyrosine to dopachrome. - "J. Inv. Derm.", 1974, vol.63, N 4, p.374-377.

R a m a k r i s h n a R a o K., S c h a n m u g a s u n d a r a m E.R. - "Canad. J. Microbiol.", 1967, vol.13, N 4, p.423. Цит. по: Л я х С.П., Р у б а н Е.Л. Микробные меланины. М., 1972. 185 с.

S i z r J.W. Oxidation of proteins by tyrosinase and peroxidase. - In: Advances in Enzymology, 1953, vol.XIV, p.129-161.